

Т-2 МИКОТОКСИН БИОТЕСТИРОВАНИЕ НА *STYLONYCHIA MYTILUS* И *DAPHNIA MAGNA STRAUS*

Шуралев Э.А.^{1,2,3}, Валиуллин Л.Р.², Никитин О.В.¹, Семёнов Э.И.²

¹ *Казанский (Приволжский) федеральный университет (Казань),*

² *Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности (Казань),*

³ *Казанская государственная медицинская академия (Казань)*

Микотоксины оказывают негативное влияние на иммунологические процессы, что сопровождается нарушением иммунной системы и, как следствие, проявлением в более тяжелых формах инфекционных, онкологических и аллергических заболеваний. Причиной микотоксикозов, снижающих резистентность организма, могут служить такие микотоксины, как афлатоксины, охратоксины, патулин, Т-2 токсин, дезоксиниваленол, зеараленон и другие [1-3]. Продуцентами микотоксинов являются в основном грибы родов *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* [4]. Наиболее токсичным из всех изученных микотоксинов является Т-2 токсин, способный вызывать уродства и мертворождения, серьезные разрушения в кроветворных и иммунокомпетентных органах, а органами-мишенями Т-2 токсина являются костный мозг, селезенка, лимфоидная ткань [5-6]. ПДК Т-2 токсина в пищевых продуктах составляет 0,1 мг/кг, а в детском питании его содержание вообще не допускается.

Биологические методы исследования токсичности основаны на способности биотоксинов (в т.ч. и микотоксинов) проявлять негативный эффект в виде цитотоксического, канцерогенного, нефротоксического действия, нарушения дыхательной функции митохондрий, белок-липидных взаимодействий [7-9]. Наряду с молекулярно-генетическими методами индикации [10], в литературе описаны микробиологические тесты, когда в качестве индикаторных культур используются микроорганизмы: *Candida* sp. (Т-2 токсин), *Bacillus* sp. (афлатоксин В1), *Erwinia* sp. (зеараленон). Люминесцентный бактериальный тест основана на определении изменения интенсивности биолюминесценции бактерий под воздействием токсических веществ, а уменьшение интенсивности биолюминесценции пропорционально токсическому эффекту [11]. Биотестирование на планариях основано на прижизненной компьютерной морфометрии процесса регенерации этих плоских червей [12]. Метод биопробы на кроликах основан на дермонекротическом действии токсичных веществ микогенного

происхождения [13]. Интерес вызывает использование ракообразных, которые широко используются при биотестировании [14-15].

Целью данной работы была сравнительная оценка перспектив использования в качестве тест-объекта стилонихий (*Stylonychia mytilus* Ehr.) и дафний (*Daphnia magna* Straus) при экспериментальном Т-2 микотоксин биотестировании.

Материалы и методы. Для экспериментальных исследований использовали кристаллический Т-2 токсин, полученный в лаборатории микотоксинов ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». В экспериментальной части работы использовали гриб *Fusarium sporotrichiella*, который служил продуцентом микотоксинов. Экстракты из проб готовили с использованием ацетона. Навеску исследуемого материала массой $10,0 \pm 0,1$ г помещали в колбу и заливали определенным количеством ацетона в зависимости от вида материала. Колбу встряхивали в течение 2 мин, затем отстаивали 10-15 мин. Т-2 токсин растворяли в 5% водно-спиртовом растворе, который служил положительным контролем. В качестве материала для исследований использовали 15 образцов проб продовольственного сырья (зерно злаковых), полученного из различных регионов РФ.

Биотестирование на инфузориях (*S.mytilus*), основанное на извлечении из исследуемых образцов проб различных фракций токсических веществ параллельно ацетоном и водой, с последующим воздействием этих экстрактов на простейших. Оценку результата биотестирования проводили по выживаемости инфузорий, которую рассчитывали по формуле: $N = (N_2/N_1) \times 100$, где N – выживаемость стилонихий (%), N_1 – среднее арифметическое количества живых стилонихий в начале опыта, N_2 – среднее арифметическое количества выживших стилонихий по окончании опыта, 100 – перевод результата в проценты.

Биотестирование на дафниях (*D.magna*) основано на определении выживаемости дафний при воздействии токсичных веществ, присутствующих в исследуемой пробе, по сравнению с контрольной культурой в пробах, не содержащих таковых веществ. Количество живых и мертвых дафний определяли методом прямого подсчета (ПНД Ф Т 14.1:2:3:4.12-06).

Результаты. Первоначальными исследованиями определили, что Т-2 токсин, использовавшийся в качестве контроля, при концентрации 100 мкг/л (ПДК) оказывает токсичное действие на простейших (*S.mytilus*), при воздействии в течение 60 мин жизнеспособность сохранили $70,0 \pm 3,6\%$ стилонихий (табл. 1). При использовании концентрации 50 мкг/л (0,5 ПДК),

токсин оказывает слаботоксичный эффект, при воздействии в течение 90 мин. выживаемость составила $76,7 \pm 1,2\%$.

Для установления токсичности образцов проб сырья использовали рабочий раствор в концентрации 1:200. Исследования на всех образцах проводились одновременно, контролем токсичности служил Т-2 токсин, использовавшийся в концентрациях 100 мкг/л (ПДК) и 50 мкг/л (0,5 ПДК). Результаты, полученные при проведении экспериментов с образцами проб продовольственного сырья (табл. 1), указывают на то, что в основном исследованные образцы являются нетоксичными, три пробы являются слаботоксичными (образцы №3, №6 и №10), и две пробы оказались токсичными (образцы №7 и №9).

Таблица 1. Выживаемость *Styloynchia mytilus* (%) при биотестировании образцов проб продовольственного сырья

№ образца пробы / контроль	Экспозиция, мин.		
	30	60	90
1	$82,0 \pm 2,0$	$62,7 \pm 2,5$	$63,7 \pm 3,5$
2	$92,7 \pm 2,5$	$83,0 \pm 2,3$	$81,7 \pm 2,9$
3	$64,3 \pm 4,0$	$46,0 \pm 1,3$	$42,7 \pm 2,3$
4	$73,0 \pm 2,5$	$65,0 \pm 2,7$	$54,0 \pm 3,5$
5	$100,0 \pm 0,0$	$90,7 \pm 1,3$	$82,3 \pm 4,0$
6	$82,3 \pm 2,5$	$67,0 \pm 3,0$	$45,0 \pm 1,0$
7	$66,7 \pm 2,9$	$55,0 \pm 2,0$	$33,2 \pm 2,3$
8	$83,0 \pm 2,3$	$80,0 \pm 2,0$	$76,3 \pm 3,4$
9	$67,5 \pm 3,3$	$46,0 \pm 1,0$	$25,2 \pm 1,2$
10	$71,3 \pm 2,5$	$55,0 \pm 2,0$	$40,0 \pm 2,0$
11	$91,3 \pm 2,3$	$82,0 \pm 2,0$	$75,7 \pm 2,5$
12	$74,3 \pm 4,0$	$67,5 \pm 3,3$	$51,4 \pm 2,2$
13	$91,0 \pm 3,6$	$82,3 \pm 2,5$	$82,0 \pm 1,2$
14	$92,7 \pm 2,5$	$83,0 \pm 2,3$	$73,5 \pm 2,5$
15	$100,0 \pm 0,0$	$93,0 \pm 2,0$	$90,0 \pm 1,0$
Т-2 токсин (ПДК, 100 мкг/л)	$91,6 \pm 3,6$	$70,0 \pm 3,6$	$63,7 \pm 6,7$
Т-2 токсин (0,5 ПДК, 50 мкг/л)	$97,0 \pm 2,0$	$89,6 \pm 1,0$	$76,7 \pm 1,2$

При экспериментальных исследованиях на дафниях (*D.magna Straus*) вначале определяли эффект воздействия на них реагентов, используемых в ходе пробоподготовки исследуемого сырья и Т-2 токсина. Установлено, что в течение 48 часов ни одна особь (n=5) не погибла (табл. 2), а значит, что реагенты (вода, ацетон, спирт), применяемые для приготовления вытяжек, не оказывают негативного воздействия на организм рачков.

Таблица 2. Выживаемость *Daphnia magna Straus* (%) при воздействии Т-2 токсина и экстракта из образцов проб продовольственного сырья (в каждом случае n=5)

Образец / контроль / реагент	Экспозиция, ч.	
	24	48
вода	100,0±0,0	100±0,0
ацетон	100,0±0,0	100±0,0
спирт	100,0±0,0	100±0,0
Т-2 токсин, 210 мкг/л	0,0±0,0	0,0±0,0
Т-2 токсин, 150 мкг/л	0,0±0,0	0,0±0,0
Т-2 токсин, 100 мкг/л	33,3±11,5	13,3±11,5
Т-2 токсин, 10 мкг/л	60,0±0,0	46,7±11,5
Т-2 токсин, 1 мкг/л	73,3±11,5	66,7±11,5
Т-2 токсин, 0,1 мкг/л	100,0±0,0	86,7±11,5
Образец № 7	66,7±11,5	53,3±11,5
Образец № 9	53,3±11,5	46,7±11,5

Далее экспериментальным путем определяли эффект воздействия различных концентраций Т-2 токсина и экстракта из образцов №7 и №9 (см. выше) проб продовольственного сырья на выживаемость дафний (табл. 2). Результаты данных исследований показали, что Т-2 токсин даже в очень малых концентрациях (0,1 мкг/л) оказывает губительное воздействие на дафний, а концентрация 150 мкг/мл убивает всех рачков менее чем за 24 ч. Токсическое действие экстракта из образцов проб №7 и №9, выявленное на стилонихиях, было подтверждено и на дафниях.

Заключение. Биотестирование является удобным для работы, быстрым и достаточно простым в исполнении, дешевым методом определения токсичности. Установлено, что дафнии, равно как и простейшие (стилоники), являются перспективными тест-объектами при микотоксин биотестировании.

Т-2 токсин в концентрации 150 мкг/л действует губительно на дафний в 100% случаев менее чем за 24 ч, а при 10 мкг/мл и экспозиции 48 ч выживает менее 50% особей.

Литература

1. Семёнов Э.И. Сочетанное воздействие Т-2 токсина, дезоксиниваленола и зеараленона / Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т.14, №14. – С. 302-306.
2. Беляева Л.Л., Танасева С.А. Условия роста мицелиальных грибов и биосинтез микотоксинов / Научный медицинский вестник. – 2015. – №1(1). – С. 45-60.
3. Шабунин С.В., Беляев В.И., Ефанова Л.И., Алехин Ю.Н. Биологические токсиканты алиментарного происхождения / Российская сельскохозяйственная наука. – 2016. – №1. – С. 51-53.
4. Семёнов Э.И., Потехина Р.М., Габдуллина С.Р., Семёнова С.А., Шуралев Э.А., Тремасов М.Я. Загрязненность продовольственного сырья грибом *Aspergillus fumigatus* / Успехи медицинской микологии. – 2016. – № 16. – С. 225-227.
5. Валиуллин Л.Р., Семенов Э.И., Вафина Р.А., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Иванов А.А. Снижение рисков загрязнения продовольственного сырья грибами рода *Aspergillus* и их метаболитами / Успехи медицинской микологии. – 2014. – Т.13. – С. 355-356.
6. Валиуллин Л.Р., Хайруллин Д.Д., Семенов Э.И., Егоров В.И., Шуралев Э.А., Рагинов И.С. Комбинированное воздействие микотоксинов на физиологические показатели крыс / Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – Т.221, №1. – С. 45-48.
7. Семенов Э.И., Дорожкин В.И., Тремасов М.Я., Канарский А.В. Перекисное окисление липидов при Т-2 токсикозе и применении полисахаридного адсорбента / Успехи медицинской микологии. – 2015. – Т.14, №14. – С. 307-309.
8. Семенова С.А., Потехина Р.М., Семенов Э.И., Валиев А.Р., Мишина Н.Н., Хусаинов И.Т. Оценка токсичности кормов по регионам Российской Федерации / Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2015. – № 224. – С. 196-199.

9. Иванченко О.Б., Мартынова Е.А. Влияние микотоксина фумонизина В1 на межклеточное взаимодействие бактерий и дрожжей / Успехи медицинской микологии. – 2016. – №16. – С. 206-210.
10. Ндайишимийе Э.В., Хаммадов Н.И., Осянин К.А., Фаизов Т.Х., Шуралев Э.А., Мукминов М.Н. Биоинформационный анализ олигонуклеотидов для молекулярно-генетической индикации возбудителей аспергиллеза и аскофероза пчел / Ветеринарный врач. – 2015. – № 2. – С. 3-9.
11. Зарубина А.П., Юдина Т.П. Люминесцентный бактериальный тест в токсикологической оценке загрязнения зерна пшеницы микотоксинами // Съезд токсикологов России. Москва. Тезисы докладов. – Москва, 2003. – С. 114-115.
12. Медведев И.В., Комов В.Т. Воздействие ртуторганических соединений природного происхождения на регенерацию у двух пресноводных планарий *Dugesia tigrina* и *Polycelis tenuis* / Онтогенез. – 2005. – Т. 36, № 1. – С. 35-40.
13. Иванов А.В., Трemasов М.Я., Папуниди К.Х. Методические рекомендации по профилактике микотоксикозов животных. – Москва, 2010. – 114 с.
14. Nikitin O. Aqueous medium toxicity assessment by *Daphnia magna* swimming activity change / Advances in Environmental Biology. – 2014. – V. 8, № 13. – P. 74-78.
15. Nikitin O.V., Petrova V.M., Latypova V.Z. Bioassay of pyrethroid insecticide esfenvalerate using fractal analysis of *Daphnia magna* motion / Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2015. – V. 6, № 6. – P. 1729-1736.